

**Untersuchungen zur Genetik
der menschlichen Serum-Paraoxonase
an Hand von 11 Familien
aus dem Raum Baden-Württemberg**

Vorgelegt

von

Klaus Otto Behringer

aus

Nürnberg

1976
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. H. -B. Wuermeling

Untersuchungen zur Genetik der menschlichen
Serum-Paraoxonase an Hand von 11 Familien
aus dem Raum Baden-Württemberg

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

dem

Fachbereich Medizin

der

Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

KLAUS OTTO BEHRINGER

aus Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan : Professor Dr. E. Rügheimer
Referent : Professor Dr. Dr. M. Geldmacher- v. Mallinckrodt
Korreferent : Professor Dr. H. -B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Dezember 1976

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A	Einleitung	1
	Allgemeiner Überblick über Organophosphorsäure- verbindungen:	
	1) Toxische Eigenschaften des E 605	5
	2) Toxische Eigenschaften des E 600	6
B	Enzymatischer Abbau von Organophos- phorsäureverbindungen	7
C	Untersuchungen zur Genetik der mensch- lichen Serum-Paraoxonase	16
D	Problemstellung	19
E	Eigene Untersuchungen:	
	Untersuchungen zur Genetik der menschlichen Serum- Paraoxonase an Hand von 11 Familien (48 Personen) aus dem Raum Baden-Württemberg (Stuttgart-Heilbronn)	20
	I. Methodik zur Messung der Serum-Cholinesterase- aktivität und deren Restaktivität nach Vergiftung durch E 600 mit Butyrylcholinjodid als Substrat in der Warburg-Apparatur	20
	1) Gewinnung des Serums	20
	2) Verwendete Apparatur	20
	3) Inkubation mit E 600	21
	4) Messung der Serum-Cholinesteraseaktivität und deren Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 ...	21
	II. Ergebnisse bei den 11 untersuchten Familien	24
F	Diskussion und Zusammenfassung	29
G	Literaturverzeichnis	31

A EINLEITUNG

Allgemeiner Überblick über Organophosphorsäureverbindungen

Organophosphorverbindungen werden als Weichmacher für Kunststoffe, als Extraktionsmittel, als Oxydationsinhibitoren für Schmieröle usw. eingesetzt.

Als interessanteste Anwendungsmöglichkeit wurde aber die biologische Wirksamkeit bestimmter Organophosphorverbindungen in der Humanmedizin und der Schädlingsbekämpfung erkannt.

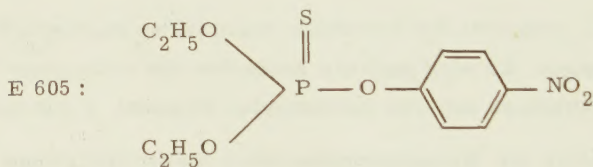
Schrader (1944) entdeckte die wertvollen insektiziden Eigenschaften dieser Verbindungen. Er wird auch als Entdecker der wichtigsten Vertreter dieser Stoffklasse mit dem bekanntesten Präparat E 605 genannt.

Grob (1947) klärte den Wirkungsmechanismus dieser Stoffgruppe auf. Er stellte fest, daß die Phosphorsäureester die Cholinesterasen stark hemmen, also ähnliche Wirkung zeigen, wie dies für die Physostigmingruppe bekannt ist. Es gibt reversible und irreversible Cholinesterasehemmer. Zu den ersteren gehört das Eserin und Prostigmin. Da diese Stoffe nur eine reversible Verbindung mit den Esterasen eingehen, können sie durch Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration wieder verdrängt werden. Dies ist nicht möglich bei den Alkylphosphaten. Diese organischen Phosphorsäureester verbinden sich fest und rufen eine irreversible Hemmung hervor. Da der Körper nicht in der Lage ist, seine Cholinesterase rasch zu ersetzen, steigt der Acetylcholinspiegel im Gewebe und Blut laufend an. Dies führt zu Dauerdepolarisation an vielen erregbaren Membranen und damit zum Erlöschen lebenswichtiger cholinergischer Erregungstransmissionen, was den Tod des vergifteten Organis-

mus, meist durch Lähmung der Atemmuskulatur oder Herzstillstand, zur Folge hat.

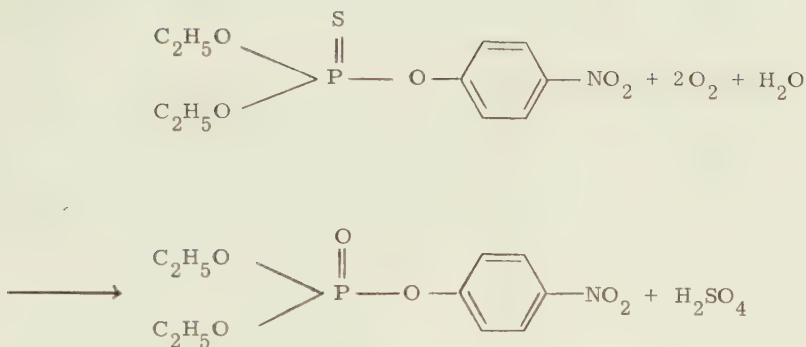
Seit über drei Jahrzehnte wird das Insektizid E 605 als Pflanzenschutzmittel verwendet, wobei dieser Stoff immer wieder bei accidentellen Vergiftungen, bei Vergiftungen in suicidaler Absicht oder als Mordmittel in Erscheinung trat.

Der Wirkstoff E 605 (Parathion, O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thiophosphat), 1944 von Schrader hergestellt, liegt heute an der Spitze der produzierten insektiziden Phosphorsäureester.



E 605 ist eine gelbbraune, lauchartig riechende Flüssigkeit; es löst sich in den meisten organischen Lösungsmitteln. Parathion ist in neutraler bis saurer Lösung gegen hydrolytische Einflüsse recht beständig, in alkalischem Milieu wird es dagegen in kurzer Zeit verseift.

Durch Oxydationsmittel wird Parathion leicht unter Bildung von Schwefelsäure in den analogen Phosphorsäureester (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) überführt.



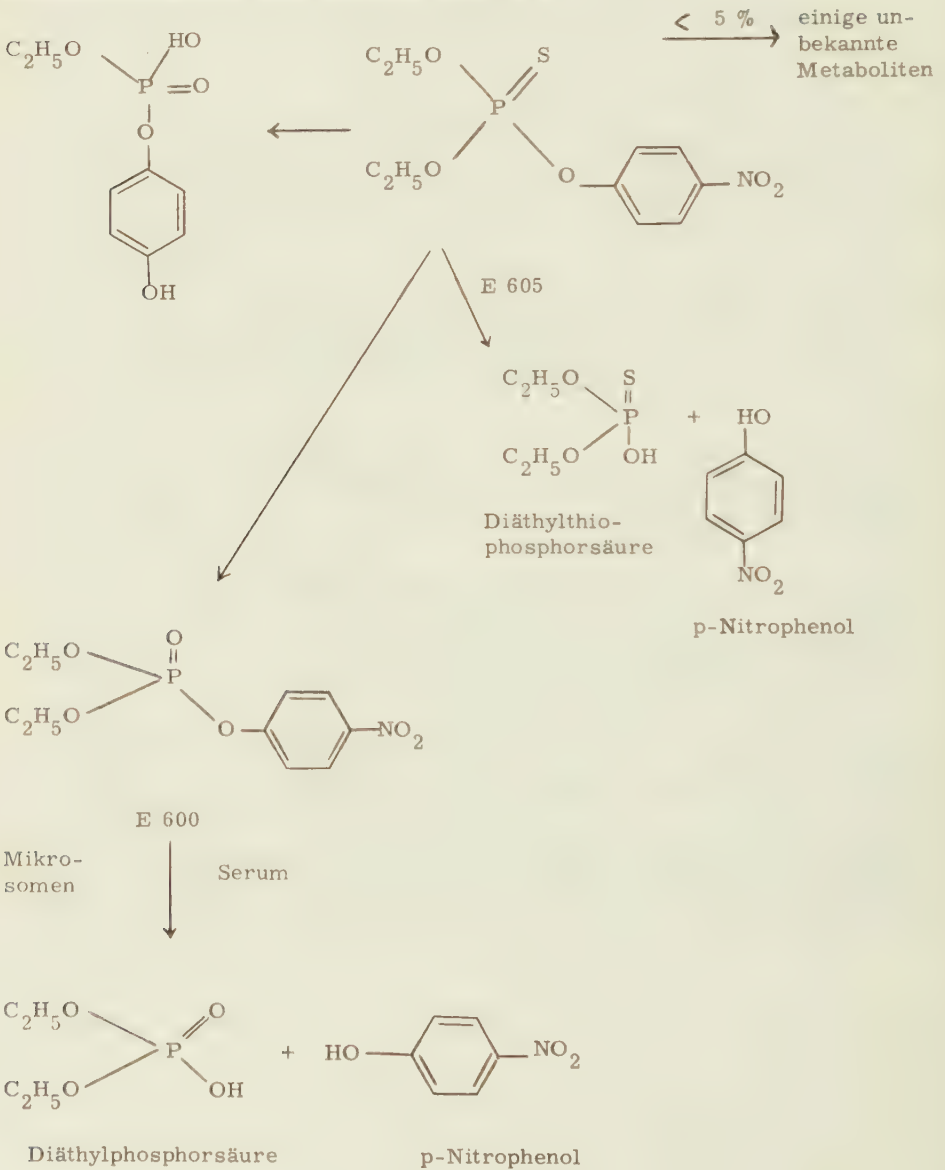
Dieser chemische Vorgang läuft im menschlichen Organismus unter dem Einfluß von Fermenten ab.

Neal (1967), Nakatsugawa und Dahm (1967) stellten in der Leber von Ratten die Oxydation von Parathion zu Paraoxon mit P^{32} -markierten Präparaten fest.

Die Oxydation von E 605 zu E 600 im menschlichen Körper entspricht einer Aktivierung seiner Hemmwirkung gegen Cholinesterasen. Im Stoffwechsel folgt eine enzymatische Hydrolyse der $\text{P}=\text{O}$ -Verbindung an der Säure-Anhydrid-Bindung (Koelle, 1963; Mazur, 1946; Neal, 1967). Der Stoffwechsel des E 605 im Warmblüter ist in Abb. 1 dargestellt.

Abb. 1

Stoffwechsel von E 605 im Warmblüter (nach Neal 1967)



Quecke (1954) stellte fest, daß Parathion bzw. sein Oxydationsprodukt Paraoxon hemmend auf verschiedene Fermentsysteme wirken. Er faßt die Hemmung als Phosphorylierung bestimmter Zentren (OH-, NH₂-Gruppe) von Enzymen auf. Wird in Parathion die Nitrogruppe durch Wasserstoff ersetzt, dann resultiert daraus eine Verbindung, welche nicht mehr die Eigenschaft hat, phosphorylierend auf Fermente zu wirken (Schrader, 1954). Die Verbindung hat dann nur noch die Eigenschaften eines untoxischen Triesters der Thiophosphorsäure.

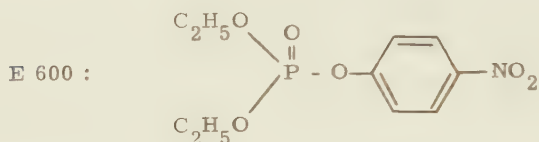
1) Toxische Eigenschaften des E 605

Bei der universellen Verbreitung des Pflanzenschutzmittels E 605 kamen durch unsachgemäße Handhabung Unglücksfälle vor. Daraufhin wurde E 605 genau auf seine toxischen Eigenschaften untersucht. Die eingehendsten Tierversuche sind in den pharmakologischen Instituten der Bayer-Werke angestellt worden. Je nach verwendeter Tierart und Form der Applikation wurden für den Menschen Mengen von 0,45 bis 2,8 g reinen Wirkstoffes als dosis letalis errechnet. Bei Kindern empfiehlt es sich, die dosis letalis mit dem Wert von 15 - 16,4 mg pro kg Körpergewicht anzusetzen (Wirth, 1967).

Bei niedrigen Temperaturen wirkt E 605 langsamer, bei steigender Temperatur wird die insektizide Wirkung erheblich vergrößert. Zwischen den einzelnen Phosphorsäureestern bestehen in ihrer Cholinesterasehemmwirkung erhebliche quantitative Unterschiede, so ist zum Beispiel E 600 ein wesentlich stärkerer Hemmstoff als E 605.

Das 1944 von Schrader hergestellte E 600 (Paraoxon, O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) besitzt ausgezeichnete insektizide und

akarizide Wirkung. Die hohe Warmblüttoxizität von Paraaxon zog der praktischen Anwendung als Systeminsektizid enge Grenzen.



E 600 ist in reinem Zustand ein farbloses, kaum riechendes Öl. In den meisten organischen Lösungsmitteln ist es leicht löslich. Paraaxon ist gegen hydrolytische Einflüsse relativ beständig.

Wirth (1967) berichtet ausführlich über die Pharmakologie von E 600. Paraaxon wird als Mioticum und Antiglaukomatosum unter der Bezeichnung "Mintacol" in der augenärztlichen Praxis verwendet.

2) Toxische Eigenschaften des E 600

E 600 ist für den menschlichen Organismus ein sehr starkes Gift; der Ester wirkt auf verschiedene Fermentsysteme (OH-, NH₂-Gruppen) stark hemmend. Der Cholinesterase-Hemmwert für die 50 %ige Cholinesterasehemmung (I₅₀) liegt etwa bei 10⁻⁸ M. (Geldmacher - v. Mallinckrodt, Rabast und Lindorf, 1969).

B ENZYMATISCHER ABBAU VON ORGANO- PHOSPHORSÄUREVERBINDUNGEN

Mazur und Bodanski (1946 a) stellten fest, daß sich beim Menschen und beim Kaninchen im Plasma und in den Geweben ein DFP-hydrolysierendes Enzym befindet, das sich mit einer bekannten Cholinesterase oder Phosphatase nicht identisch zeigte. Bei ihren Untersuchungen wurde DFP nur zu einem extrem niedrigen Anteil an der Alkyl-Ester-Bindung, jedoch in entscheidendem Maße an der Phosphor-Fluor-Bindung gespalten. Mazur und Bodanski (1946 b) konnten das verantwortliche Enzym 30-fach konzentrieren, unter Verlust der Phosphatase-, Esterase- und Cholinesterase-Aktivität, und gaben ihm den Namen "Phosphofluorase" bzw. "Fluorophosphatase" (Grob, 1947).

Aldridge (1953 a) untersuchte Serumesterasen bei Kaninchen, Ratte und Pferd. Dabei fand er zwei Typen von Esterasen, die er hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch Paraoxon in eine A-Esterase und eine B-Esterase einteilte: Die A-Esterasen (Aryl- oder Aromatic-Esterase) werden durch E 600 nicht gehemmt, während die B-Esterasen durch E 600 in einer Konzentration von 10^{-7} bis 10^{-8} M gehemmt werden.

Aldridge konnte das Vorkommen von A-Esterasen bei 10 verschiedenen Tierarten nachweisen (bei der Ente verlief der Nachweis negativ). Auch im menschlichen Serum wurde diese A-Esterase nachgewiesen.

Wenig später fand Aldridge (1953 b) ein E 600-hydrolysierendes Enzym, genannt E 600-Esterase, wobei er durch vergleichende Experimente feststellte, daß sie identisch mit der schon bekannten A-Esterase ist, jedoch nicht mit sauren und alkalischen Serumphosphatasen. Inner-

halb der einzelnen Tierarten schwankten die jeweiligen Enzymaktivitäten; dies, glaubte er, sei auf die Proteinunterschiede zurückzuführen.

Mounter und Whittaker (1953) hielten von den fünf bestehenden Phenol-ester-hydrolysierenden Esterasen (erythrocyte-aceto-cholinesterase, plasma-butyrylcholinesterase, erythrocytealiesterase, erythrocyte-aromati-cesterase, plasma-aromati-cesterase) des menschlichen Blutes die erythrocyte-aromati-cesterase und die plasma-aromatic-esterase für sehr ähnlich, wenn nicht sogar für identisch. Nach Mounter und Whittaker sind die beiden wahrscheinlich identisch mit der von Aldridge (1953 a; 1953 b) gefundenen A-Esterase.

Augustinsson und Heimbürger (1954 a; 1954 b; 1954 c; 1954 d; 1954 e; 1955 a; 1955 b; 1957) beschäftigten sich in ausgedehnten Untersuchungen über die enzymatische Hydrolyse von organischen Phosphorverbindungen, hauptsächlich mit Tabun, welches durch ein Enzym ("tabunase") hydrolysiert wird. "Tabunase" ist jedoch nicht spezifisch für Tabun, deshalb führten Augustinsson und Heimbürger eine allgemeine Bezeichnung für organische Phosphorverbindungen-hydrolysierende Enzyme ein: "Phosphorylphosphatase".

In Cohn'schen Fraktionen trennten Augustinsson und Heimbürger (1954 b) aus dem menschlichen Serum die "Phosphorylphosphatase" und die Cholinesterase von den anderen Enzymen ab. Fraktion IV-1: Tabunase; Fraktion IV-6: Cholinesterase.

Bei der hydrolytischen Spaltung wird Tabun an der P-CN-Bindung getrennt; die dabei entstehenden Reaktionsprodukte üben einen schwach hemmenden Einfluß auf die Tabunaseaktivität aus; etwa 15% des ursprünglichen Tabuns werden in der enzymatischen Hydrolyse nicht ange-

griffen (Augustinsson und Heimbürger, 1954 c).

In einer Untersuchung über die Spezifität der Tabunase zeigten Augustinsson und Heimbürger (1954 a), daß die Tabunase (Phosphorylphosphatase) sowohl Tabun, DFP wie E 600 hydrolysiert; wobei E 600 auch durch andere Enzyme gespalten werden kann. Augustinsson und Heimbürger (1954 e) vermuten, daß E 600 sowohl durch die Aldridge'sche A-Esterase als auch durch eine Phosphorylphosphatase hydrolysiert wird, die beide wahrscheinlich in der Cohn'schen Fraktion anwesend sind.

Friedberg und Erdmann (1959) beobachteten eine spontane Reaktivierung durch E 600 vergifteter Cholinesterasen in vitro bei Pferde- und Rinderseren, die durch eine rasche Zerstörung des E 600 im Serum bedingt ist; dafür machten sie gleichfalls eine "Phosphorylphosphatase" verantwortlich.

Main (1960) versuchte das E 600-hydrolysierende Enzym aus dem Schafserum möglichst rein darzustellen. Durch eine etwa 350fache Anreicherung erreichte Main ein 80-95 %ig reines Enzympräparat. Er stellte eine Zunahme der Michaeliskonstanten von 0,29 mM auf 4,2 mM fest, was er auf "Paraoxonase"-Aktivatoren im Nativserum zurückführte, welche durch den Reinigungsvorgang entfernt worden zu sein scheinen. Main (1960) ermittelte das Molekulargewicht der Paraoxonase mit 35 000 bis 50 000.

Schaumann und Schiller (1960) untersuchten die Inaktivierung von Cholinesterasen-Hemmern in vitro mit den Seren weißer Mäuse. Sie

gingen davon aus, daß an der Inaktivierung zwei voneinander unabhängige Vorgänge beteiligt sind: eine Absorption an das Serum und eine fermentative Zerstörung. Paraoxon wird durch das Serum schnell abgebaut und stark adsorbiert.

Erdös und Boggs (1961) bestätigten, daß mehrere Faktoren für die Hydrolyse von O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)phosphat (E 600) im menschlichen Serum verantwortlich sind. Sie zeigten, daß die Paraoxonhydrolysierende Aktivität in der Fraktion IV-1 zwar durch Äthylendiamintetraacetat vollständig gehemmt werden kann, daß aber hierbei die Gesamtaktivität des Nativserums erfaßt war. Auf der Suche nach einer Äthylendiamintetraacetat-resistenten Aktivität fanden sie eine E 600 -spezifische Enzymaktivität im Humanalbumin, die durch Aluminium völlig auszuschalten war.

Skrinjarik - Spoljar und Reimer (1968) beschrieben die fermentative Spaltung von E 600 und Armin (O-Äthyl-O-(p-nitrophenyl)-äthylphosphonat) durch menschliches Serum. Sie verwandten defibriniertes Blut gesunder Erwachsener beiderlei Geschlechts innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme. Als Substrat dienten 7,5 mM Paraoxon und 7,5 mM Armin, als Puffer 25 mM Tris-HCl (pH 7,0). Die Hydrolyse erfolgte bei 37°C. Das freigesetzte p-Nitrophenol wurde mit einem Gemisch aus Toluol und n-Butanol extrahiert. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, daß die Nativseren wahrscheinlich ein Enzym mit bevorzugter Paraoxonaseaktivität besaßen, weil in der Mehrzahl der Fälle Paraoxon schneller als Armin hydrolysiert wurde, während bei einer Mischung der Serum-Eiweiß-Fractionen IV₁ und V die Arminaseaktivität die der Paraoxonase stets übertraf.

Krisch (1968) beschrieb, daß menschliches Serum E 600 in einer Konzentration von etwa 10^{-4} M fermentativ spaltet. In seinen Untersuchungen versuchte er eine nähere Charakterisierung dieser Enzymaktivität. Bei seiner Versuchsanordnung lag das pH-Optimum im stark alkalischen Bereich bei etwa 11,0. Er verwandte die Seren von 25 männlichen und 25 weiblichen Versuchspersonen und erhielt Paraoxon-spaltende Aktivitäten von 38 - 190 μ Mol p-Nitrophenol pro Minute und Liter Serum. Er fand dabei zwei sich überlagernde Gruppen, die sich durch den Wert der Esteraseaktivität unterschieden. Die Esteraseaktivität derselben Versuchsperson schwankte dabei nur innerhalb enger Grenzen. Veränderungen innerhalb der Enzymaktivität unter pathologischen Bedingungen und bei Stoffwechselkrankheiten (Diabetes mellitus, Leukämie, Anämien, Urämie, Plasmocytom, Carzinom, Herzinfarkt usw.) ergaben sich nicht.

Krisch (1968) hielt es auf Grund seiner Untersuchungen für möglich, daß die Aktivitätsunterschiede genetisch bedingt sind. Allerdings war eine genaue Zuordnung der einzelnen Versuchspersonen zu einer der beiden Gruppen wegen der Überlagerungen nicht immer möglich.

Geldmacher-v. Mallinckrodt, Rabast und Lindorf (1969) sowie Geldmacher-v. Mallinckrodt und Lindorf (1969) stellten Unterschiede in der Vergiftbarkeit menschlicher Serumcholinesterasen mit dem Alkylphosphat E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) fest. Bei der Messung der Cholinesteraseaktivität von 75 Seren nach Inkubation mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ M Konzentration fanden sie eine Aufteilung in drei Gruppen: nämlich mit niedriger, mittlerer und hoher Cholinesterase-Restaktivität (Tab.1).

Tab. 1

Normalaktivität und Restaktivität nach Vergiftung von 75 menschlichen Seren mit $3,2 \times 10^{-8}$ M E 600 sowie Aufteilung der Seren in drei Gruppen (nach Geldmacher- v. Mallinckrodt und Lindorf, 1969).

Gruppe	Anzahl der Personen	davon		Normalaktivität in $\mu\text{l CO}_2/60 \text{ min}$ u. 0,05 ml Serum	Restaktivität nach Vergiftung in % d. Normalaktivität
		♂	♀		
I	38	22	16	110 - 278	0,0 - 5,5
II	22	10	12	135 - 235	13,0 - 21,0
III	15	9	6	130 - 285	29,0 - 51,0

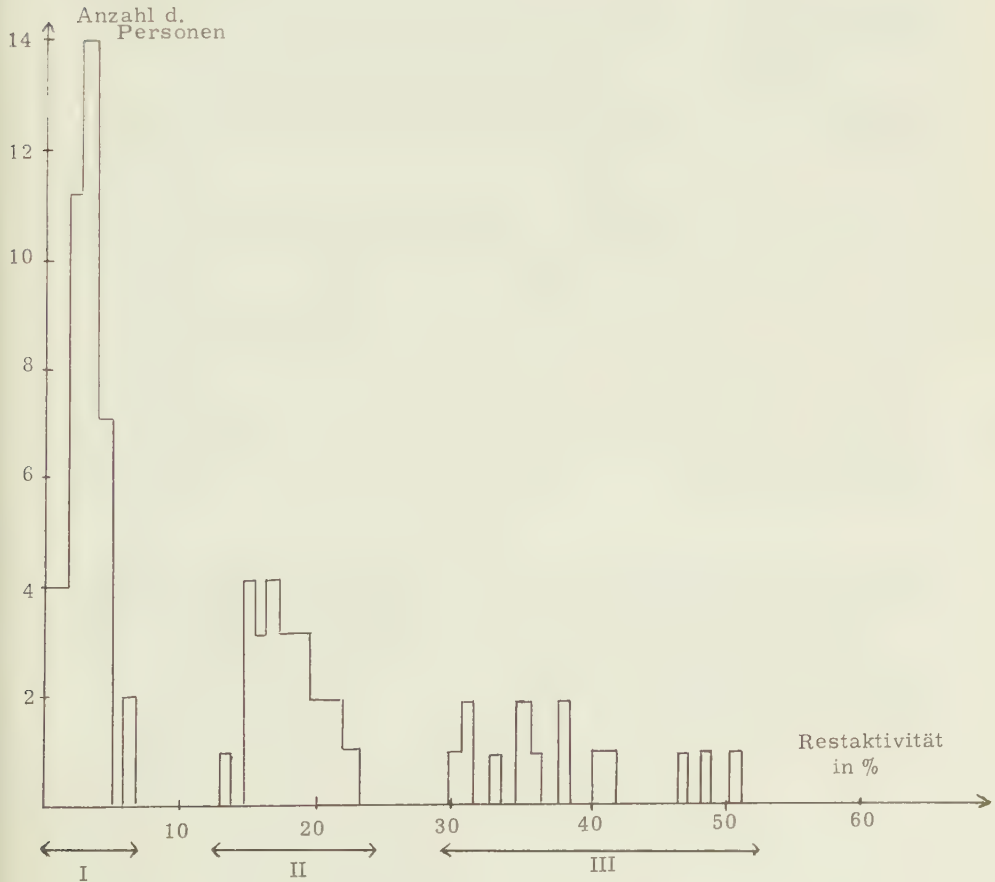
Dabei ergab sich folgender prozentualer Anteil:

Gruppe	I	"niedrig"	51 %
Gruppe	II	"mittel"	29 %
Gruppe	III	"hoch"	20 %

In Abbildung 2 ist die Anzahl der Personen mit einer bestimmten Restaktivität graphisch wiedergegeben.

Abb. 2

Cholinesterase-Restaktivität von 75 menschlichen Seren nach Vergiftung mit E 600 ($c = 3,2 \times 10^{-8} \text{ M}$) nach Geldmacher-v. Mallinckrodt und Lindorf, (1969).



Für die unterschiedliche Hemmung der Serumcholinesterase gibt es zwei Möglichkeiten: Die Unterschiede können:

- 1) durch einen Polymorphismus der Serumcholinesterase,
- 2) aber auch durch einen Polymorphismus des E 600-spaltenden Ferments bedingt sein.

Durch Messung von Enzymaktivitäten vor und nach Inkubation mit bestimmten Hemmstoffen ist bei den Cholinesterasen des menschlichen Serums schon mehrfach eine Zuordnung zu gut definierten Typen erfolgt (Goedde, Doenicke und Altland 1967). Untersuchungen über den Polymorphismus des E 600-spaltenden Ferments wurden bereits erwähnt (Aldridge 1953; Friedberg und Erdmann 1959; Schiller und Schaumann 1960; Main 1960; Erdös und Boggs 1961; Skrinjarik-Spoljar und Reiner 1968; Krisch 1968).

Geldmacher - v. Mallinckrodt et al. (1969) halten es für möglich, daß während des Ablaufs der Cholinesterasehemmung durch E 600 genetisch bedingte Unterschiede in der Aktivität der Paraoxonase, die E 600-Konzentration so variieren, daß unterschiedliche Restaktivitäten der Cholinesterasen verbleiben, wobei die Cholinesterase selbst keinen Polymorphismus aufweisen müssen, sondern als empfindliches Indikatorsystem für die verbleibende E 600-Konzentration und die jeweilige Paraoxonaseaktivität dienen.

Geldmacher - v. Mallinckrodt, Baumgartner, Petényi, Burgis, Lindorf und Metzner (1972) untersuchten deshalb den Zusammenhang zwischen dem fermentativen E 600- Abbau und der Vergiftung der Cholinesterase durch E 600 im menschlichen Serum.

Personen, die niedrige Cholinesterase-Restaktivitäten aufweisen, besa-

ßen auch nach dem Verfahren von Krisch (1968) eine niedrige E 600-spaltende Aktivität. Versuchspersonen mit mittlerer Cholinesterase-Restaktivität zeigten mittlere bis hohe Paraoxonaseaktivitäten. Das gleiche galt für Probanden mit hoher Cholinesterase-Restaktivität. Der errechenbare Korrelationskoeffizient war $r = 0,82$.

Auffällig ist, daß Krisch (1968) eine bimodale, Geldmacher-v. Mallinckrodt und Lindorf (1969) hingegen eine trimodale Verteilung fanden. Dafür können aber die unterschiedlichen Meßmethoden verantwortlich sein, z.B. arbeitete Krisch (1968) mit einer E 600-Konzentration von 10^{-4} M, während Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1969) bei ihrer Anti-ChE - Technik eine Konzentration von $3,2 \times 10^{-8}$ M verwendeten. Der gefundene Korrelationskoeffizient von 0,82 macht es wahrscheinlich, daß die unterschiedlichen Vergiftungsgrade menschlicher Serumcholinesterasen nach Vergiftung in vitro mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ M Konzentration zum größten Teil durch Unterschiede in der Serum-Paraoxonase-Aktivität im Sinne von Krisch (1968) bedingt sind.

C UNTERSUCHUNGEN ZUR GENETIK DER MENSCHLICHEN SERUM-PARAOXONASE

Eine Geschlechtsabhängigkeit der unterscheidbaren Gruppen konnte weder Geldmacher- v. Mallinckrodt et al. (1969), vgl. Tabelle 2, noch Krisch (1968) feststellen.

Tab. 2

Prüfung einer Geschlechtsabhängigkeit der Paraoxonaseaktivität menschlicher Seren, gemessen mit der Anti-ChE-Technik nach Geldmacher- v. Mallinckrodt et al. (1973).

Gruppe	n		Mittlere Cholinesterase-Restaktivität	mit Standardabweichung
	♂	♀	♂	♀
I	54	55	2,36 ± 0,97	2,37 ± 1,11
II	19	18	16,12 ± 1,75	17,07 ± 1,77
III	8	7	39,43 ± 4,43	37,24 ± 5,00

Die Übereinstimmung zwischen den beiden Geschlechtern ist in jeder Gruppe mit 99,9 %-iger Wahrscheinlichkeit gesichert (t-Test).

Krisch (1968) vermutete, daß der von ihm erstmals bemerkte Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase genetisch bedingt sei.

Geldmacher- v. Mallinckrodt, Lindorf, Petényi, Flügel, Fischer und Hiller (1973) untersuchten 35 Familien mit insgesamt 52 Kindern mit der Anti-ChE-Technik. Sie deuteten ihre Ergebnisse durch ein 2-Allele-System (Tabelle 3).

Tab. 3

Gewählte Bezeichnung für die Paraoxonasetypen

Serumcholinesterase- Restaktivität (Anti- ChE - Technik)	Serum-Paraoxo- nase - Aktivität	Paraoxonasetyp	
		früherer Name	neuer Name
niedrig	niedrig	Gruppe I	1-1
mittel	mittel	Gruppe II	2-1
hoch	hoch	Gruppe III	2-2

Die Ergebnisse der Familienuntersuchungen sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Sie widersprechen in keinem Fall dem angenommenen Modell.

Auch Geldmacher- v. Mallinckrodt et al. (1973) halten danach Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase höchstwahrscheinlich für genetisch determiniert.

Tab. 4

Serum-Paraoxonase-Typen bei 35 Familien mit 52 Kindern
(Anti-ChE-Technik) nach Geldmacher- v. Mallinckrodt et al.
(1973).

Eltern		Kinder		
Paarungen	Familien n	Typ		
		1-1 n	2-1 n	2-2 n
1-1 x 1-1	12	13	-	-
1-1 x 2-1	11	9	8	-
1-1 x 2-2	2	-	3	-
2-1 x 2-1	4	3	3	1
2-1 x 2-2	4	-	5	4
2-2 x 2-2	2	-	-	3
	35	25	19	8

D PROBLEMSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit soll es sein, die Untersuchungen zur Genetik der menschlichen Serum-Paraoxonase fortzuführen, und zwar durch gezielte Untersuchungen zur Genetik der menschlichen Serum-Paraoxonase im Raum Baden-Württemberg (Stuttgart - Heilbronn).

E EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Untersuchungen zur Genetik der menschlichen Serum-Paraoxonase an Hand von 11 Familien (48 Personen) aus dem Raum Baden - Württemberg (Stuttgart - Heilbronn)

I Methodik zur Messung der Serum-Cholinesteraseaktivität und deren Restaktivität nach Vergiftung durch E 600 mit Butyrylcholinjodid als Substrat in der Warburg-Apparatur

1) Gewinnung des Serums

In den 11 untersuchten Familien wurden den Eltern und ihren Kindern jeweils ca. 8 ml Blut mit Hilfe von Venülen (Firma Boehringer) entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, daß es sich um gesunde Personen handelte (kein Diabetes mellitus, keine Hepatitis usw.). Anschließend wurde das Blut bei 1600 U/min 15 Minuten lang zentrifugiert. Das erhaltene Serum wurde sofort abgetrennt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Die vorgesehenen Messungen wurden möglichst noch am gleichen Tag vorgenommen.

2) Verwendete Apparatur

Die Serumcholinesteraseaktivität und deren Restaktivität wurden in einer Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, mit der manometrischen Methode von Ammon (1934) in der Modifikation von Friedberg und Sakai (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7.2, bestimmt.

3) Inkubation mit E 600

Zur Vergiftung des Ferments wurden 1 μ l E 600 auf 90 ml Aqua dest. gegeben. 20 ml dieser Lösung wurden sodann zu 27 ml der Verdünnungsflüssigkeit gegeben und 16 Minuten lang geschüttelt. Diese Verdünnungsflüssigkeit war eine Mischung aus 20 Teilen einer 0,9 %igen NaCl-Lösung und 3 Teilen einer 1,26 %igen NaHCO_3 -Lösung.

Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der entsprechenden E 600-haltigen Verdünnungsflüssigkeit verdünnt. Die E 600-Konzentration im Inkubationsansatz war $3,2 \times 10^{-8}$ M.

Von den Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes pipettiert; im Hauptraum derselben befand sich 1,5 ml einer 0,54 %igen wäßrigen Lösung von Butyrylcholinjodid.

Die Warburggefäße wurden nun an Manometer angeschlossen und sofort in das Wasserbad von 37°C gebracht. Anschließend wurden alle Manometer mit einem Gasgemisch aus 5 % CO_2 und 95 % N_2 20 Minuten lang durchströmt; dies ist in Abb. 3 dargestellt.

Sodann wurde nach Schließen der Manometerhähne noch solange bei 37°C inkubiert, daß eine Gesamtinkubationsdauer von 60 Minuten erreicht war.

Der pH-Wert lag während der Inkubationszeit bei 7,7 (Süllmann 1964).

4) Messung der Serum-Cholinesteraseaktivität und deren Restaktivität nach Vergiftung mit E 600

Nach beendeter Inkubation wurde die Serumverdünnung in der Anhangs-

birne in den Hauptraum der Warburggefäße gekippt; der pH-Wert lag nun bei 7,2 (Süllmann 1964).

Es wurde bei geöffneten Hähnen drei Minuten geschüttelt (Schüttelfrequenz 100/min), anschließend die Manometervordifferenz abgelesen und die Manometer geschlossen. Der Manometerstand wurde dann nach weiteren 15 min und 30 min abgelesen.

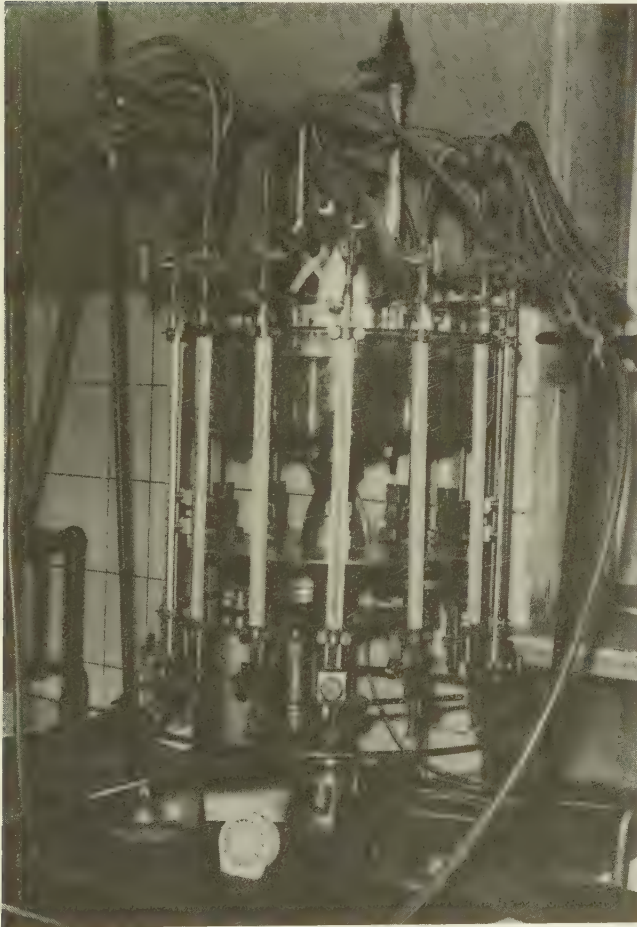
Die Seren wurden in Doppelbestimmung mit und ohne E 600 bei Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat auf ihre Restaktivität getestet. Zur Kontrolle liefen je Versuch zwei Leerwerte mit, in denen die Anhangsbirne der Warburggefäße nur Verdünnungsflüssigkeit enthielt, wodurch die Eigenhydrolyse erfaßt wurde.

Jede Doppelbestimmung wurde zweimal durchgeführt, so daß in zwei Versuchsabläufen drei verschiedene Seren mit jeweils insgesamt vier Leerwerten, vier unvergifteten und vier vergifteten Ansätzen auf ihre Aktivität und Restaktivität geprüft wurden. Die 30-Minuten-Werte der Doppelmessung wurden mit der entsprechenden Manometerkonstanten multipliziert (Süllmann 1964). Ebenso wurde der Leerwert errechnet. Sodann wurde das arithmetrische Mittel für beide Wertpaare gebildet und der Leerwert von der Fermentmessung abgezogen. Auf diese Weise wurde auch der zweite Versuchslauf ausgewertet und aus beiden Ergebnissen wiederum das arithmetrische Mittel gebildet.

Die Angabe der Ausgangsaktivität der Cholinesterase erfolgt in $\mu\text{l CO}_2/30 \text{ min}$, die Restaktivität wird in Prozent der Ausgangsaktivität angegeben.

Abb. 3

Warburg-Apparatur Typ V 85
der Firma Braun Melsungen



Die Warburggefäße im Wasserbad von 37°C, angeschlossen an die Manometer, während der CO₂-N₂-Begasung.

II Ergebnisse bei den 11 untersuchten Familien

Für unsere Untersuchungen stellten sich 11 Familien aus dem Raum Baden-Württemberg (Stuttgart - Heilbronn) mit ihren 26 Kindern zur Verfügung.

Unsere Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt, wobei die Darstellung unter der Annahme der Gültigkeit des 2-Allele-Systems (Geldmacher- v. Mallinckrodt, Lindorf, Petényi, Flügel, Fischer und Hiller, 1973) erfolgt.

Tab. 5

Ausgangsaktivität der Serumcholinesterase (AA) und deren Restaktivität (RA) nach Vergiftung mit $3,2 \times 10^{-8}$ M E 600 sowie Paraoxonasetyp.

Familie	Alter	AA ($\mu\text{l CO}_2$ / 30 min)	RA (%)	Paraoxo- nasetyp
1) <u>E h n i</u>				
Richard	56	210	33,0	2-2
Elisabeth	54	235	29,3	2-2
Wolfgang	25	192	37,6	2-2
Ursula	29	187	45,8	2-2
2) <u>B r e g e n s e r</u>				
Otto	56	212	28,7	2-2
Ingeborg	54	217	20,7	2-1
Stephani	18	203	21,3	2-1
Claudia	20	197	19,9	2-1

3)	<u>Gerlach</u>				
	Harold	57	220	1,4	1-1
	Ingeborg	54	274	23,1	2-1
	Roland	22	278	6,7	1-1
4)	<u>Dr. Weßel</u>				
	Otto	85	180	6,2	1-1
	Lina	88	230	6,1	1-1
	Hans-Otto	57	186	5,9	1-1
	Hedwig	55	172	1,8	1-1
5)	<u>Schröck</u>				
	Paul	71	178	12,0	2-1
	Maria	75	172	1,9	1-1
	Annemarie	44	184	2,7	1-1
	Peter	38	166	6,5	1-1
	Hanne	39	195	5,5	1-1
6)	<u>Bertelshofer</u>				
	Richard	54	215	2,3	1-1
	Waltraud	51	197	24,6	2-1
	Dietlind	22	186	4,8	1-1
	Uta	21	155	4,7	1-1
	Elke	21	220	5,3	1-1
7)	<u>Krug</u>				
	Fritz	63	131	12,1	2-1
	Friedel	60	159	36,2	2-2
	Brigitte	22	160	18,7	2-1
	Annette	19	174	16,6	2-1

8) <u>Hannweg</u>				
Hermann	38	178	5,2	1-1
Irmgard	36	181	22,8	2-1
Renate	16	176	13,7	2-1
Hermann	15	189	12,3	2-1
Elisabeth	13	187	12,0	2-1
9) <u>Eggert</u>				
Harry	43	175	14,4	2-1
Carola	38	160	5,7	1-1
Jochen	22	217	15,5	2-1
Ulf	18	224	6,9	1-1
10) <u>Sottek</u>				
Manfred	35	232	49,8	2-2
Helga	35	173	29,0	2-2
Andre	12	240	35,1	2-2
Anke	10	238	35,8	2-2
Silke	7	230	36,4	2-2
Heike	6	231	34,1	2-2
11) <u>Frank</u>				
Hans	59	178	14,4	2-1
Ilse	54	210	2,4	1-1
Annemarie	18	142	3,8	1-1
Lothar	21	243	13,8	2-1

Die Ergebnisse der Familienuntersuchung sind in Tabelle 6 noch einmal im Hinblick auf die Serum-Paraoxonase-Typen geordnet. Die Er-

gebnisse widersprechen in keinem Fall dem angenommenen 2-Allele-System, sondern machen wahrscheinlich, daß der Polymorphismus genetisch determiniert ist.

Tab. 6

Serum-Paraoxonase-Typen bei 11 Familien mit 26 Kindern aus dem Raum Schwaben (Anti-ChE-Technik).

Eltern		Kinder		
Paarungen	Familien n	Typ		
		1-1 n	2-1 n	2-2 n
1-1 x 1-1	1	2	-	-
1-1 x 2-1	6	9	5	-
1-1 x 2-2	-	-	-	-
2-1 x 2-1	-	-	-	-
2-1 x 2-2	2	-	4	-
2-2 x 2-2	2	-	-	6
	11	11	9	6

Bei unseren Untersuchungen stellten wir drei bezüglich ihrer Restaktivität deutlich voneinander getrennte Gruppen fest, die folgende Werte aufweisen:

	Restaktivität in % von der Ausgangs- aktivität	Anzahl der Personen
Gruppe I	0,0 - 7,0	19
Gruppe II	12,0 - 25,0	17
Gruppe III	28,5 - 50,0	12

Die Reaktivität der Gruppe III war breiter gestreut und zeigte Werte im Bereich von 28,5 - 50,0 . Dies wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß die gewählte E 600- Konzentration bereits in der Nähe von I_{50} liegt, d.h. in dem steilen Anstieg der Kurve, welche die Beziehung zwischen Restaktivität und dem negativen Logarithmus der E 600-Konzentration wiedergibt (Geldmacher- v.Mallinckrodt, Rabast und Lindorf, 1969).

F DISKUSSION UND ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe dieser Arbeit war es, die Familienuntersuchungen zur Genetik der menschlichen Serum-Paraoxonase fortzuführen, wobei der Schwerpunkt der Familienuntersuchungen im Raum Baden-Württemberg (Stuttgart - Heilbronn) lag.

Unsere Familienuntersuchungen machten wir mittels der Anti-ChE - Technik in der Warburg-Apparatur, Methode nach Ammon (1934), in der Variation von Friedberg und Sakai (1958); die E 600-Konzentration lag bei $3,2 \times 10^{-8}$ M; die Inkubationsbedingungen waren: pH 7.7 ; 60 Minuten lang bei 37°C ; als Substrat verwendeten wir Butyrylcholinjodid.

Wir fanden Unterschiede in der Vergiftbarkeit der menschlichen Serum-Cholinesterase nach Inkubation mit E 600, die eine Einteilung in drei deutlich voneinander abgegrenzte Gruppen möglich machte, nämlich mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität, entsprechend Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1969).

Wie bereits 1968 Krisch vermutete, daß der Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase genetisch bedingt sei, so gelangten Geldmacher-v. Mallinckrodt et al. (1973) zur selben Aussage, wobei sie ihre Ergebnisse mit einem 2-Allele-System deuteten.

Unsere Familienuntersuchungen über die Genetik der menschlichen Serum-Paraoxonase im Raum Schwaben (Stuttgart - Heilbronn) widersprechen in keinem Fall dem angenommenen 2-Allele-System, sondern unterstreichen und bestätigen die Ergebnisse und Vermutungen von

Geldmacher- v. Mallinckrodt et al. (1972), daß der Polymorphismus der menschlichen Serum-Paraoxonase genetisch determiniert ist.

Eine genetische Abhängigkeit stellten auch Eckstein und Bartel bei ihren Untersuchungen im mittelfränkischen und im norddeutschen Raum fest.

Um zu einer definitiven Klärung der genetischen Abhängigkeit zu kommen, müssen erstens weitere Familien untersucht werden, zweitens müßte auch auf die Familienkonstellation 1-1 x 2-2 und 2-1 x 2-1 eingegangen werden, da diese Paarungen in unseren Untersuchungen fehlten. Weitere Untersuchungen sind bereits im Gange.

G LITERATURVERZEICHNIS

Aldridge, W.N.:

Serum esterases. 1. Two types of esterase (a and b) hydrolysing p-nitrophenyl-acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.

Biochem. J. 53, 110 (1953 a)

Aldridge, W.N.:

Serum esterase. 2. An enzyme hydrolysing diethyl-p-nitrophenyl-phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.

Biochem. J. 53, 117 (1953 b)

Ammon, R.:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins.

Pflüg. Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)

Augustinsson, K.B. und G. Heimbürger:

The enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

Biochem. Biophys. Acta 13, 303 (1954 a)

Augustinsson, K.B. und G. Heimbürger:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

I. Occurence of enzymes hydrolysing dimethylamidoethoxy-phosphoryl cyanide (Tabun).

Acta Chem. Scand. 8, 753 (1954 b)

Augustinsson, K. B. und G. Heimbürger:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

II. Analysis of reaction products in experiments with Tabun and some properties of blood plasma tabunase.

Acta Chem. Scand. 8, 762 (1954 c)

Augustinsson, K. B. und G. Heimbürger:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

III. Effect of cholinesterase inhibition and inhibition of cholinesterase in the presence of tabunase.

Acta Chem. Scand. 8, 915 (1954 d)

Augustinsson, K. B. und G. Heimbürger:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

IV. Specifity studies.

Acta Chem. Scand. 8, 1533 (1954 e)

Augustinsson, K. B. und G. Heimbürger:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

V. Effect of phosphorylphosphatase on the inactivation of cholinesterase by organophosphorus compounds in vitro.

Acta Chem. Scand. 9, 310 (1955 a)

Augustinsson, K. B. und G. Heimbürger:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.

VI. Effect of metallic ions on the phosphorylphosphatases of human serum and swine kidney.

Acta Chem. Scand. 9, 383 (1955 b)

Augustinsson, K.B. und G. Heimbürger:

Enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds.
VII. The stereospecificity of phosphorylphosphatases.
Acta Chem. Scand. 11, 1371 (1957)

Bartel, M.:

^Dissertation Erlangen (in Vorbereitung).

Eckstein, H.:

Dissertation Erlangen (in Vorbereitung).

Erdös, E.G. und Boggs, L.E.:

Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
Nature 190, 716 (1961)

Friedberg, K.D. und W.D. Erdmann:

Spontane Reaktivierung der durch Alkylphosphate (Paraoxon,
Systox, Isosystox) blockierten Cholinesterase in vitro.
Naunyn Schmiedebergs Arch. exp. Path. u. Pharm. 237, 1 (1959)

Friedberg, K.D. und F. Sakai:

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Alkylphosphaten
(E 600, E 605, Systox) in Blut und Hirngewebe mit Hilfe
eines fermentreaktivierenden Antidots (PAM).
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

Geldmacher- v. Mallinckrodt, M. und H. Lindorf:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen
mit Alkylphosphaten.
Vortrag auf der 48. Tagung der Deutschen Gesellschaft für
Rechtsmedizin in Berlin 1969

Geldmacher- v. Mallinckrodt, M., H. Lindorf und U. Rabast:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serumcholinesterasen
mit E 600.

Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

Geldmacher- v. Mallinckrodt, M., W. Baumgartner, M. Petényi,
H. Burgis, H. Lindorf und H. Metzner:

Korrelation der unterschiedlichen Vergiftbarkeit der Serum-
Cholinesterase E 600 und der Aktivität des E 600-spaltenden
Enzym-Systems in menschlichen Seren.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 217 (1972)

Geldmacher- v. Mallinckrodt, M., H. Lindorf, M. Petényi,
M. Flügel, T. Fischer und T. Hiller:

Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen
Serum-Paraoxonase (EC 3.1.1.2.).

Humangenetik 17, 331 (1973)

Goedde, H.W., A. Doenicke, K. Altland:

Pseudocholinesterasen

Berlin - Heidelberg - New York, Springer 1967

Grob, D.:

The administration of di-isopropyl fluorophosphate (DFP) to man.

I. Effect on plasma and erythrocyte cholinesterase; general
systemic effects; use in study of hepatic function and erythro-
poiesis; and some properties of plasma cholinesterase.

Bulletin John Hopkins Hospital 81, 217 (1947)

Koelle, G.B. :

Cholinesterase and anticholinesterase agents.

Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Ergänzungswerk.

Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg (1963)

Krisch, K. :

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat
(E 600) durch menschliches Serum.

Z. klin. Chem. klin. Biochem. 6, 41 (1968)

Main, A.R. :

The purification of the enzyme hydrolysing diethyl-p-nitro-
phenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum.

Biochem. J. 74, 10 (1960)

Mazur, A. und O. Bodansky:

The mechanism of in vitro and in vivo inhibition of cholinesterase
activity by diisopropyl fluorophosphate.

J. Biol. Chem. 163, 261 (1946 a)

Mazur, A. und O. Bodansky:

An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phos-
phorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates.

J. Biol. Chem. 164, 271 (1946 b)

Mounter, L.A. und V.P. Whittaker:

The hydrolysis of esters of phenol by cholinesterases.

Biochem. J. 54, 551 (1953)

Nakatsugawa, T. und P.A. Dahm:

Microsomal metabolism of parathion.

Biochem. Pharmacol. 10, 391 (1967)

Neal, R.A.:

Studies on the metabolism of diethyl-4-nitrophenyl-phosphorothionate (parathion) in vitro.

Biochem. J. 103, 183 (1967)

Quecke, K.:

Das Präparat E 605.

Marburg/L., Dustrie-Verlag (1954)

Schaumann, W. und M. Schiller:

Inaktivierung von Alkylphosphaten im Gehirn und im Serum.

Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. 239, 114 (1960)

Schrader, G.:

Chlorthion: Ein neues wenig giftiges Insektizid aus der Reihe der Thiophosphorsäureester.

Angewandte Chem. 66, 265 (1954)

Skrinjaric-Spoljar, M. und E. Reiner:

Hydrolysis of diethyl-p-nitrophenylphosphate and ethyl-p-nitrophenylethylphosphate by human sera.

Biochem. Biophys. Acta 165, 289 (1968)

Süllmann, E.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung des Gewebsstoffwechsels.

In: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse.

Herausgegeben von K. Lang und E. Lehnartz, Bd VI A, Teil A, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York: Springer (1964)

Wirth, W. :

Toxikologie - Fibel

für Ärzte, Apotheker, Naturwissenschaftler, Juristen und Studierende.

Von Wolfgang Wirth, Gerhard Hecht, Christian Gloxhuber.
Stuttgart: Thieme 1967

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir,
Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling für
die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut
und für die Übernahme des Korreferates
zu danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr.
Dr. M. Geldmacher- v. Mallinckrodt für
die Überlassung dieses Themas, ihre unge-
wöhnlich große Hilfsbereitschaft und für
den zu jeder Zeit freundlich erteilten Rat.

Herrn Dr. Lorke von der Firma BAYER
bin ich für das zur Verfügung gestellte
E 600 zu Dank verpflichtet.

LEBENS LAUF

Geboren : 5. April 1951 in Nürnberg

Eltern : Dr.med. Konrad Behringer, Augenarzt (gest. 1961)
Dr.med. Hedwig Behringer, Augenärztin

Schulen : 1957-1961 Grimmschule in Nürnberg
1971 Abitur am humanistischen Melanchthon-
Gymnasium in Nürnberg

Studium : Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg, Beginn WS 1971/72

Vorphysikum August 1972
Physikum April 1974

Staatsexamen: 1. Dezember 1976

Erlangen, im Dezember 1976

Klaus Otto Behringer

Buchdruck – Offsetdruck

Karl Döres, 852 Erlangen, Jägerstr. 3 · Tel. 2 15 21